The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	軟寒天ゲル内培養におけるコロニー形成能に関するチャイニーズ・ハムスター細胞温度感受性変異株の分離とその性状
Author(s)	宮下, 紀一
Citation	大阪大学, 1974, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/797
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

生物化学専攻博士学位論文

論文題目

軟寒天ゲル内培養におけるコロニー形成能に関するチャイニーズ・ハムスター細胞温度感受性変異株の分離とその性状

宮下紀一

大阪大学微生物病研究所
腫瘍ウィルス部門

1974. 2. 9.

コクヨ 20×20

はじめに

今日までに、化学物質、ウィルス、放射線等多様な物質について、その発がん性が報告されて来た。特に腫瘍ウィルスは、in vitro 発がんに成功して以来著しい発展をとげ、形質転換した細胞内でのウィルス・ゲノムの存在様式とその制御を受けている細胞の形質もかなり明らかになってきた。[1] しかし、形質転換を細胞側からとらえること、即ち細胞自身に内在している形質転換の機構については、細胞の取扱いが非常に困難なために、殆んど不明のままである。細胞のがん化という一見同じ現象が、非常に性質の異なった物質によってひき起されるそれぞれの過程の間の共通性や相違点を探ることは発がん機構解明に役立つと考えられる。この観点から、自然発生的に形質転換した細胞より、形質転換細胞の形質維持に関する温度感受性変異細胞株を分離し、他の指標との連関の有無について検

討を行なった。

現在、in vitro 形質転換の指標としては、1. 細胞形態の変化[2-6]、2. 増殖の接触阻止からの離脱[2-8]（飽和細胞密度の上昇）3. ゲル内浮遊状態（軟寒天ゲル・メチル・セルロース・ゲル）での増殖能の獲得[9-13]、4. 無かンマ・グロブリン血清中、或は低濃度血清中での増殖性の上昇[14-17]、5. 植物凝集素による細胞凝集能の上昇[18-23]等多くの性状があげられているが、これらの諸性質の中で、in vivo における腫瘍原性と特によく平行しているのは、ゲル内浮遊状態での増殖能獲得であることが報告されている[24-25]。上記観点より、BUdR－光線照射法を選択手段とし、ゲル内増殖能を指標として温度感受性変異株を分離し、得られた変異株について他の2～3の主な指標との連関について検討を行った。

材料と方法

細胞と培養

自然発生的に形質転換したチャイニーズ・ハムスター肺繊維芽細胞（東北大　山根績博士より分与）を軟寒天ゲル内培養し、そのコロニーを分離、クローニングして原株とした。

細胞の継代はプラスチックシャーレで行い、培養液には5％子牛血清を含むF12培養液[26]を用い、培養液交換は週に2回行った。但し軟寒天ゲル内培養には子牛血清を10％添加した培養液を用いた。

細胞は5％CO_2インキュベーター内で、39.5℃（高温）、又は、34.5℃（低温）で培養を行った。

軟寒天ゲル内コロニー形成率

角永、釜洞（1968）[24]の方法に従った。予め作製しておいた寒天5％を含む保存寒天培地を加温して溶かし、42℃にあたためた

培養液で各濃度に稀釈した。 0.25%トリプシンで分散させた単離細胞を血球計算板で数えた後、培養液で稀釈し、0.6%寒天培地と1:1に混合して、1×10^4個/mlの細胞を含む0.3%寒天培地とした。 5mlの0.5%寒天培地を底に敷いて固まらせておいたガラスシャーレ(40mm)に、細胞を含む0.3%寒天培地1mlを植えこみ、固まらせて後指定温度で培養した。 3週間の後、直径0.16mm以上のコロニーを数え、植込細胞数(10^4)に対する%で、コロニー形成率を表わした。

メチル・セルロース・ゲル内培養

Stoker等の方法[27]に従い、1.3%メトセル(メチルセルロース、粘稠度4,000センチポイズ、和光純薬)培養液を作製した。 この液9容と、細胞懸濁液1容をまぜ合せ、最終濃度1.17%メトセル細胞懸濁液とし、0.5%寒天培地を敷いたガラスシャーレに、シャーレ当り1~2ml($1\sim2\times10^5$細胞/シャーレ)

まき込んだ。

細胞数倍加時間と増殖曲線

35mmプラスチックシャーレに、5～6×10^4個の細胞を植え込み、培養し、日を追ってトリプシンで細胞を分散し、コールター・カウンター（Coulter Electronics社製、モデルZB）でシャーレ当りの細胞数を数えた。

細胞数倍加時間は、増殖期の増殖曲線より算定した。

平板培養におけるコロニー形成率

トリプシンで分散させた200個の細胞を、5mlの培養液の入った、60mmプラスチックシャーレに植え込んだ。10日間培養した後、メチルアルコールで固定し、ギムザ液で染色してコロニー数を数えた。形成率はまき込み数に対するコロニー数の%で表わした。

DNA合成の測定

直径15mmのカバーグラスの入った、35mmプラスチックシャーレに、5～10万個の細胞を植え込み培養し、経時的に、2μC/mlの^{3}H－チミジンで、パルス・ラベルを行った。パルスの後カバーグラスを取り出し、4℃のCa^{++}, Mg^{++}抜きのリン酸緩衝生理食塩水（PBS(－)）で2回洗い、乾燥させ、メタノールで固定した。更に、4℃において、2%過塩素酸溶液で、40分間酸可溶性分画を抽出した。水洗いを4回行い、酸を除いた。白熱光で乾燥させた後、液体シンチレーション・カウンター（ベックマン製）で酸不溶性分画にある^{3}Hの放射能をカウントして、DNA合成能とした。

コンカナバリンA（コンA）による凝集能

電気泳動で単一ピークを示すコンA（第一化学）を、飽和食塩水にとかし、飽和食塩水に対して透析した。PBS(－)で適当に稀釈して、PBS(－)に対して充分透析して塩を

除き、1 mg/mlの溶液とした。これは分注して、−20°Cに凍結保存し、使用直前に溶かした。

凝集能の測定法は、基本的には、Oppenhimer と Odencratz[29] によった。

増殖期にある細胞を予じめ42°Cに温めておいたPBS(−)で3回洗い、0.01%EDTA−PBS(−)を加えて、それぞれの温度に60分〜90分間インキュベートした。その後、細胞をいためないよう静かにピペッティングして細胞を集め、遠心して細胞をPBS(−)で洗った。洗いをもう一度行い、PBS(−)で10^6個/mlの細胞懸濁液にした。この0.2 mlを各濃度のコンAが0.2 ml入った試験管(1.1 cm × 1.5 cm)に加え、振とう機(毎分80回)で5分間振とうした。4°Cに冷したPBS(−)10 mlを各試験管に加え、凝集しないで残っている単離細胞をコールター・カウンターで数えた。単離細胞の70〜80%を数え、2個以上が凝集した時は数から除外するコールター・カ

ウンターの調整は次の通りである。

1/Amplification ＝16

1/Aparture current＝1/4

Window setting ＝21～70

凝集能の表示は、残っている単離細胞の％で表わした。

温度感受性変異細胞の分離方法

DNA合成期にある細胞は、チミジンの類似物質であるBUdR（5－ブロモ－2－デオキシウリジン）をDNAにとり込み、その後のUVや可視光線に鋭敏になって、死にやすくなることが知られている。[31-32] この方法を利用して非許容温度下、軟寒天ゲル内で増殖し得る細胞の生存率をBUdR－光線照射法で低下させ、目的の変異細胞株の頻度を上昇させるネガティブ・セレクションを分離方法の基本とした。軟寒天ゲル内培養は、メトセル・ゲル内培養で代替え未、細胞の回収がメトセル・ゲルの方が容易であることから、[27-28] メトセ

ル・ゲル内培養を分離に用いた。　高温感受性変異細胞株の分離には、非許容温度として39.5°C、許容温度として34.5°Cを用い、その逆の低温感受性変異株の分離には、非許容温度として、34.5°C、許容温度として39.5°Cを培養温度に用いた。

分離の過程を第1図に示した。

許容温度下、平板培養で増殖期にある細胞4×10^6個を0.2μg/mlのMNNG（N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン）で8時間処理した。　この処理は、平板培養におけるコロニー形成率を、非処理群の0.06に下げることが予備実験で知られていた。　処理後、PBS(-)で2回洗い、MNNGを除き、許容温度で6～10日間培養し、変異形質の発現を待った後、0.25%のトリプシンを含むPBS(-)で細胞を分散させ、メトセル・ゲルに懸濁し、0.5%寒天培地5mlを敷いたガラスシャーレに植え込んだ。　非許容温度において、24時間培養した後、最終濃度が3μg/mlとなるよう

にBUdRを加え、引き続き48時間培養し、5倍量の培養液でピペッティングしながら細胞を集めた。遠心した細胞をPBS(−)で洗い、メトセルとBUdRを除き、約10^5個づつプラスチックシャーレ(10cm)に植え込んだ。許容温度で3時間培養し、細胞をシャーレ底面に付着させた後、30ワットの昼光色螢光灯3本(10cm間隔、9cm高さ)で1時間照射した。予備実験により、BUdR可視光線照射は、平板でのコロニー形成率でみて、細胞の生存を2×10^{-4}に低下させることが知られていた。

光線照射後、許容温度で1〜2週間培養し再び、非許容温度でBUdR−光線照射処理を行い、平板上に分散後、非許容温度で、2〜3週間培養した。

細胞形態が平たいことと、ゲル内コロニー形成率が低いこととが関連あると考えられている[33-34]ので、分離率を良くするため、非許容温度での培養で生じたコロニーの中から、平たい形態を示すコロニーをクローニングした。

クローニング後、許容温度で培養を続け、細胞が充分増殖した時点でトリプシンで分散し、0.3%軟寒天ゲル内に植え込み、許容、非許容両温度でのコロニー形成能を比較し、差の大きいクローンを変異細胞株とした。

結果

温度感受性変異細胞株の分離頻度

許容温度でのゲル内コロニー形成率に対する非許容温度でのそれが、10分の1以下に下っている株を変異株とし、高温感受性及び、低温感受性変異株の分離を行った。[第1表]

高温感受性変異株は6株得られ、最終BUdR-光線照射後の生残細胞数60,732個に対しては、9.8×10^{-5}、クローニングした、1,152個の平たい細胞1個当りでは、5.2×10^{-3}であった。

低温感受性変異株は3株得られ、BUdR-光線照射後の生残細胞11,600個に対しては、2.6×10^{-4}、クローニングした平たい細胞に対しては、9.3×10^{-3}であった。

低温感受性変異株はそれぞれ異なるシャーレからクローニングされたので、同一の変異株に由来する株ではない。

コクヨ 20×20

軟寒天ゲル内コロニー形成率

0.3％軟寒天ゲル内に、シャーレ当り10^4個の細胞を植え込み、3週間培養の後コロニーを数えて、植え込み細胞数に対する％で表わした。表2に、両温度に於けるコロニー形成率が示されている。

原株は高温では12.8％、低温では19.8％のコロニー形成率を示した。高温感受性変異株は高温に於て、0.2～1.19％、低温において12.9％～24％を示した。低温感受性変異株は、低温において、0.04％～0.3％，高温においては、11.3％～17.7％を示した。許容温度に対する非許容温度のコロニー形成率の比は、1/16.4～1/442であった。その際、非許容温度の軟寒天ゲル内で生じたコロニーは、高温、低温、両変異株共に、許容温度のコロニーの大きさに較べてはるかに小さい。これら非許容条件下で出現したコロニーをクローニングして、再び軟寒天中におけるコロニー形成能について検討したが、何れも原変異

株同様の温度感受性を示したので、継代中に逆変異をおこした細胞がコロニーを形成しているためではなく、むしろこれらのコロニーは各変異株のもつ温度感受性に関して、リーキーであるためと思われる。しかし10ケ月の継代の後、ts-222とts-103には、逆変異株が生じたが、非許容温度での小コロニーは、大部分がリーキィネスによることは変りなかった。第2図に軟寒天ゲル内コロニーの写真を示した。

温度移行の軟寒天ゲル内コロニー形成能に及ぼす影響

非許容温度下、軟寒天という特定の条件下で、変異細胞株が増殖し得ないのは、細胞死の為であるのか、或いは、細胞は生存していても、増殖能を示し得ないのかを知るために培養温度を変化させ、増殖能が回復しうるかどうかを温度移行実験によって検討した。

シャーレ当り10^4個の細胞を植え込み、軟寒

天培養を行い、許容及び非許容温度で培養を行いつつ、3日目、6日目、9日目（又は、10日目）に、一部のシャーレを移行させ、培養温度を変え、その後21日目まで培養を続けて形成されたコロニーを数えた。

その結果の一部が第3、及び第4表に示されている。第3表の左欄に見られる様に、ts-222は、許容温度（低温）で1,408個のコロニーを形成し、非許容温度（高温）では、23個のコロニーを形成した。第3日目、6日目、10日目に培養シャーレを非許容温度から許容温度に移行させ、第21日目迄培養すると、それぞれ、1,098個、780個、674個のコロニーが形成された。移行の際、0.5μg/mlのコルヒチンを加えて細胞増殖を止めた場合には、コロニーは出現しなかった。これは単なる細胞の凝集ではないことを示している。10日目に移行したシャーレは許容温度での培養日数が残り11日を余すのみであったが、コロニー数は674個を数えており、その数も、

培養日数を増すに従って増加する傾向が見られた。従って、これらのコロニーは、許容温度への移行の為、細胞に軟寒天中での増殖能が備わった結果形成されたものと判断した。

逆に、許容温度から非許容温度への移行につれての変化は、第4表、左欄に示されている。

ts-222は、第3日目、6日目、10日目に、許容温度から、非許容温度に移行させると、それぞれ33個、101個、366個のコロニーを形成するに留まった。移行時にコルヒテンを加えた場合には、第10日目で247個を数えているので、非許容温度移行下で数えられたコロニーは、既に許容温度下でその大半が形成されたと判断された。

これらの事より、ts-222は軟寒天中での増殖能が、培養温度に依存してあり、且つ、培養温度を変化させることにより、軟寒天中での増殖能を可逆的に変化させられることが明らかとなった。又、この性質はts-222に

のみ見られるのではなく、他の5株の高温感性変異株にみられる性質であった。［第3表］

第4表右欄に低温感性変異株CS－13D1についての結果が示されている。

CS－13D1は許容温度（高温）では1,352個、非許容温度（低温）では15個のコロニーを軟寒天で形成した。培養3日目、6日目、9日目に非許容温度から許容温度に、培養温度を移行させると、それぞれ、1,628個、1,380個、584個のコロニーを形成し、許容温度への移行に伴なって、軟寒天中での増殖能が高まったことが見出された。逆に第3表右欄にみられるように、許容温度から非許容温度に移行することによりコロニー数は、少なくなり、非許容温度への温度移行によって軟寒天中での増殖能が抑制されることが、見出された。

これらの事実から、CS－13D1においても、軟寒天中での増殖能は、培養温度に依存しており、且つ培養温度を変化させることにより、

コクヨ 20×20

軟寒天中での増殖能が可逆的に変化させられることが明らかとなった。又、この性質は、他の2株についても見出された。

以上、分離された変異株は、高温、低温感受性のいずれを問わず、軟寒天中での増殖能が培養温度に依存しており、同時に、温度変化により、その性質が可逆的に変化させられることがわかった。これらは所期の目的に合致する変異株である。

平板培養における増殖性

2mlの培養液の入った35mmプラスチックシャーレに、6×10^4個の細胞を植え込み、シャーレへの細胞付着条件を整えるため、一晩許容温度で培養し、翌日半数のシャーレを非許容温度に移した。

経時的にトリプシンで細胞を分散させ、コールター・カウンターを用いて、シャーレ当りの細胞数を数えた。

第3-5図に結果の一部を示した。

シャーレ当りの細胞数が少ない増殖期を見ると、原株、ts-171、CS13D1のいずれも、平板上では良好な増殖を示し、非許容温度が高温であるts-171でも、平板では高温における増殖速度が低温におけるよりも速く、原株の性質と一致した。第5表に示した細胞数倍加時間は、原株においても、いずれの変異株においても、高温の方が、低温くらべて、短かい。従って、分離した変異株は、平板上での増殖には変わりなく、軟寒天中という特定の条件下での増殖、即ち増殖調節に関する温度感受性変異株であることが明らかとなった。

飽和細胞密度

上記増殖曲線の曲線が平坦になった時点でのシャーレ当り細胞数を飽和細胞密度として、第6表に示した。原株は、高温の方が低温より高く、低温/高温の比は、0.68であった。変異株の間では飽和細胞密度は、それぞれ異なっていたが、いずれも許容温度の方が、非許

容温度より高い傾向にあった。しかし、低温/高温の比をとって、原株と比較すると、高温感受性変異株は、両温度により差が見られ、低温感受性変異株には差が見られないと判断された。

平板培養でのコロニー形成率

5mlの培養液を入れた60mmプラスチックシャーレ当り、200個の細胞を植え込み、10日～12日間培養した後、PBS(-)で洗い、メタノールで固定し、ギムザ染色してコロニー数を数えた。形成率は植え込み細胞数に対するコロニー数の%で表わした。結果を第7表に示した。

原株は高温において、16.6%、低温において、42.9%であり、2.5倍程低温の方が高いことが示された。ts-172, ts-222, CS-13D1, 及びCS13G9は両温度共良好にコロニー形成を行った。

ts-103, ts-164, ts-171, ts-211 及びCS12D9

の各株は、非許容温度でのコロニー形成率がかなり低いことが見出された。しかし、コンディショニング培養液を用いるか、3日間許容温度で培養した後、非許容温度に移行した場合には、コロニー形成率が大中に改善された。しかも多数の細胞を植え込んだ時の増殖は良好であったので、平板でのコロニー形成率の低下は、極端に少数の細胞を植込んだ場合のコンディショニングが、これらの変異株では、充分でなく、細胞が死にやすくなったことが原因と考えられる。

軟寒天では、ゲルが細胞のまわりをとりかこみ、コンディショニング・ファクターの拡散を防ぐので、平板でのコロニー形成率の低下が軟寒天中コロニー形成率の低下の直接原因とは考えられない。実際に温度移行による、コロニー形成能の可逆性が示されていることで、裏付けられる。

コロニーの形態、

シャーレに少数の細胞を植込み、12日間培養した後PBS(−)で洗い、メタノール固定後ギムザ染色し、顕微鏡下でコロニーの形態を観察した。第6図に写真を示した。

原株は、両温度共にパイル・アップし、濃く染まっているが、高温度感受性変異株は、許容温度においてはパイル・アップし、形質転換細胞に特有な形態を示したが、非許容温度においては、平たい形態を示し、パイル・アップは見られなかった。

ここには示していないが、他の高温度感受性変異株についても同様に、許容温度と非許容温度におけるコロニー形態の差が見られる。従って、高温度感受性変異株においては、軟寒天中増殖能とコロニー形態に関連があることがわかった。

低温感受性変異株は許容温度である高温においてパイル・アップし、形質転換細胞に特有な形態を示し、非許容温度においても、パイル・アップの程度は高温より低いが、形質

転換細胞に特有な形態を示した。

低温感受性変異株においては、軟寒天中の増殖能の低下とコロニー形態の変化が結びついてはいない。

非許容条件における細胞の増殖停止状態

非許容温度で数日間培養しておいた細胞をトリプシンで分散させ、メトセル・ゲルに懸濁し、シャーレ当り10^5個の細胞を植込んだ。引き続き非許容温度で48時間培養すると、細胞数の増加は殆んど停止している。この状態の細胞をピペッティングにより室温の培養液で洗い出した。メトセル・ゲルを除く為、1000rpm 5分間の遠心により細胞を分離し、培養液に再懸濁して、直径15mmのカバーグラスを入れた35mmのシャーレに5〜10万個づつ植込み、許容温度で培養した。経時的に^{3}H-チミジンでパルス・ラベルして、DNA合成能を測定し、又別にコルヒチンを一定時間加えて、その間に集積された分裂中期細胞を数

えた。第7図に結果を示した。

原株は平板に植込むとすぐにDNA合成が見られ、5時間まで幾何級数的に増加し、以後若干の低下はあるが再び上昇した。分裂中期像も植込み後すぐに数%見られ、以後順次増加した。これらは原株がゲル内においても増殖を行っていることを示している。

変異株においては、平板へ植込んでから、3時間及至は9時間の間、DNA合成は殆んど見られなかった。分裂中期像は0～17時間には殆んど見られず、17時間以降になって増加した。DNA合成に先立って、分裂中期像は見出されず、DNA合成が上昇した後、数時間経て、初めて分裂中期像が見出された事は、これら変異株が非許容温度下、ゲル内培養中では、分裂期とDNA合成期の間、即ちG1期において休止していたことを示す。

血清の要求性

形質転換した細胞は、増殖するに際しての

血清要求性が低下し、無ガンマ・グロブリン血清を用いた場合でも、よく増殖することが出来るが、正常細胞は、血清要求度が高く、無ガンマグロブリン血清を用いた場合には生育度が極めて低下することが報告されている。[14-17] 変異株の軟寒天中増殖と血清要求性との関連を検討した。無ガンマ・グロブリン血清 (Microbiological Associates Inc.) を70℃で30分間処理し、更に不活性化して用いた。50mmプラスチックシャーレ当り 1×10^4 個の細胞を植え込み、高温感受性株は第4日目、低温感受性株は第5日目にトリプシンで分散し、コールター・カウンターでシャーレ当り細胞数を数えた。表示は植込み数の何倍に増殖したかで表わした。第8表に示したように、両血清間で殆んど差が見られなかった。従ってこれらの変異株においては、軟寒天中増殖能と血清要求性とは、直接の関係はないと考えられる。それぞれの変異株間の値の違いは、コンディショニング能力の相違によると思われる。

コンカナバリンA(コンA)による細胞凝集能

形質転換細胞は、正常細胞に比較して、植物から抽出された凝集素、ウィート・ジャーム・アグルチニンやコンA等により、凝集しやすいことが報告されている。[18-23]

分離した変異株の凝集能と軟寒天中増殖能の関連を検討した。

既に述べた方法に従い、コンAによる凝集能を調べてみると、第9表の如くであった。表示は50%凝集度を示すに足るコンAの濃度(μg/ml)で表わした。

高温感受性、低温感受性変異株とを問わず、いずれも高温で培養した細胞の方が、低温で培養した細胞に比べ、やゝ凝集性が高いことがわかった。これは原株と同じ傾向であった。従ってこれらの変異株においては、軟寒天中コロニー形成能と、コンAによる細胞凝集能は、直接の関連はないと考えられる。

考察

チャイニーズ・ハムスター細胞は、他の種類の in vitro 培養細胞によく見られる染色体数異常が生じにくく、自然突然変異頻度も 10^{-7} のオーダー[35]であり、細胞継代中での変異が少なく、ある形質に関する変異細胞株を分離しその諸性質を解明するのに好都合な細胞である。この特徴を生かし、従来細胞の取扱いが非常に困難な為もあり遅れていた、細胞自身に内在しているがん形質への形質転換機構の解析系を確立することを試みた。

現在、in vitro 形質転換の指標としては、多くの性質が知られているが、in vivo における造腫瘍性と特によく平行しているのはゲル内浮遊状態での増殖能獲得であることが Kakunaga 等[24]によって報告されている。

上記観点より、BUdR可視光線照射法を選択手段とし、自然発生的に形質転換したチャイニーズ・ハムスター肺繊維芽細胞から、ゲル内

増殖能に関する温度感受性変異細胞株を分離し、得られた変異細胞株について、他の2～3の主な指標との連関を検討した。その結果軟寒天中での増殖能に関する温度感受性変異株を9株分離出来た。高温度感受性で、高温におけるコロニー形成能が低く（0.23%～1.19%）、低温におけるコロニー形成率は高い（12.9%～24%）変異株は6株、分離された。軟寒天コロニー形成率が低温において低く、（0.04%～0.3%）、高温において高い（11.3%～17.7%）低温感受性変異株を3株分離しえた。

これらの変異株の軟寒天中コロニー形成能は、温度移行によって、可逆的に変化しうることが示された。

高温感受性変異株の1つ、ts-222は、培養10日目に非許容温度から、許容温度に移行した場合にも、許容温度のみで培養された場合の48%に当るコロニーが形成された。許容温度における培養日数が、対照の約半分、11日/21日であることから、48%は、その間の

コロニー形成能が充分に上昇したことを示すに足る値である。 逆に、10日目に許容温度から非許容温度に移行した場合には、許容温度における対照群の26%を数えた。 しかし移行時にコルヒチンを加えて細胞増殖を停止させてみると、既に移行時に、コロニーの大半がカウントにかかる程に形成されていることが判明した。 従って tS-222 は軟寒天中での増殖能が培養温度に依存していて、しかも培養温度移行により、増殖能が可逆的に変化し得る変異株である。 この可逆的であるという性質は、CS-13D1 を始めとして、分離された他の全変異株に共通する性質であった。以上により目的の変異株を分離し得たといえる。

平板培養における増殖曲線を見ると、増殖期にある場合、これらの変異株は高温感受性、或いは、低温感受性を問わず、増殖は良好で、原株と同様に、低温に比べ、高温の方が増殖速度が早く、倍加時間は短かくなっていた。

従って、これらは平板での増殖能は損なわれておらず、軟寒天内増殖の調節機構が、温度感受性となっている変異株である。

平板培養におけるコロニー形成率が非許容温度においては、下がっている変異株もあるが、これらはコンディションド培養液を用いるか、許容温度で3日間培養した後に温度移行させると、コロニー形成率が大巾に改善された。これらのコンディショニングに関与した処置によって、コロニー形成率が上昇することから、平板培養において少数の細胞をまき込んだ時には、コンディショニングの不充分さによる付着性の低下と細胞死がおこると考えられる。軟寒天はゲルがコンディション・ファクターの拡散を防ぐので、培養温度移行実験でも示されているように、細胞の活性は保たれている。これら変異株は非許容温度下、軟寒天中で、G1期に止まっていることが、明らかにされた。in vitroで増殖の接触阻止[36]がかかった細胞もG1期で止まっていることと

が知られているが、両者が同一の地点で止っているかどうかは、今後の検討に待たねばならない。

これらの変異株は非許容温度下、無ガンマ・グロブリン血清中、平板培養でも、増殖性が低下することはなく、形質転換細胞の性質の一つである、血清要求性の低下と、ゲル内コロニー形成能とは、直接の関連はないことが示された。この結果はVogelとPollack[34]らがSV40で形質転換した細胞から逆変異細胞を分離して得た結論と一致した。

飽和細胞密度は、ts の場合には、非許容温度においては低く、軟寒天中コロニー形成能が低いことと連関あることが判った。平板でのコロニー形態も同様である。これは、Vogel等[34]、並びにWyke[33]がポリオーマ-BHKでの逆変異株で得た結論と一致する。しかし、クローン選択の過程に細胞形態での選択過程が入っているので、今後はランダムなクローニングにより変異株を分離して、検討を

し直す必要がある。

低温感受性変異株においては、両温度間の飽和細胞密度の差は、原株に比べて余り変化がなく、軟寒天中コロニー形成能との直接の関連は認められない。

低温感受性変異株の低温でのコロニーは、パイル・アップを示し、やはり軟寒天中コロニー形成能とは、分離しえる性質である。この逆の例、コロニー形態が一見正常であるが、軟寒天中でのコロニー形成能を有し、且つ in vivo の造腫瘍性を有する細胞株が、Kakunaga等[24]により報告されている。やはり、コロニー形態及び飽和細胞密度と軟寒天内コロニー形成能とは、直接の関連はないと考えるべき性状である。

正常細胞に較べ、形質転換細胞は、植物凝集素により、凝集しやすいことが報告されている。[18-23] コンAを用いて変異株の凝集能を検討したところ、高温感受性変異株、低温感受性変異株にかかわらず、高温で培養した細胞の

方が、低温で培養した細胞より高かった。
従って軟寒天中コロニー形成能とコンAによる凝集能は、直接の関連はないと考えられる。

以上形質転換したチャイニーズ・ハムスターの細胞を用い、in vivoでの造腫瘍性と最も良く平行しうる軟寒天中コロニー形成能に関する温度感受性変異株を分離し、細胞自身に内在する細胞形質転換機構を解明する手掛りとなる系を確立し得た。

以後、この系におけるDNA合成開始へのプロセスが如何に制御されているかを、各変異細胞間での出来事の正確な比較、及び腫瘍ウィルスのそれに及ぼす影響等を把握することによって追求したい。

又、同時に正常の形質を維持する因子と、がん形質を維持する因子との、いずれが優位であるかを、検討することにより、如何なる形で、増殖調節が行われているかを知る可能性が生じると思われる。現在、これら変異株間での細胞融合を利用した相補性テストの

為の準備が進められつつある。

Di Mayorca[37]等が、BHK21細胞より得た形質転換細胞は、たまたま軟寒天中のコロニー形成能に関して、低温感受性を示していた。自然発生的に得られた株も、ニトロソアミン類で処理して得た株も全てが低温感受性であったので、この性質は原株のBHKが既に内在して持っていた形質が抑制解除されて発現したものと考えられる。それに対し著者の得た変異株は、一方向への変異ではなく、高低温両方向への感受性を示しているので、用いた原株に内在していた形質の単なる抑制解除ではなく、まさしく突然変異によって新たに生じた変異株と考えられる。

コクヨ 20×20

謝辞

本実験に御指導頂いたこと、又、本論文執筆に当り、御助言頂いたことに対し、当教室の豊島久真男先生、角永武夫先生、羽倉明先生に深く感謝の意を表します。

コクヨ 20×20

References

1. "The Molecular Biology of Tumor Viruses" 1973. (John Tooze ed.) Cold Spring Harbor Laboratory, University of Tokyo Press.

2. Berwald, Y., and L. Sachs. 1963. Nature 200: 1182.

3. Berwald, Y., and L. Sachs. 1965. J. Nat. Cancer Inst. 35: 661.

4. Sanford, K. K., and R. E. Hoeman. 1967. J. Nat. Cancer Inst. 39: 691.

5. Borek, C., and L. Sachs. 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. 57: 1522.

6. Borek, C., and L. Sachs. 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. 59: 83.

7. Aaronson, S. A., and G. J. Todaro. 1968. Science 162: 1024.

8. Dulbecco, R. 1970. Nature 227: 802.

9. MacPherson, I., and L. Montagnier. 1964. Virology 23: 291.

10. Sanders, F. K., and B. O. Burford. 1964. Nature 201: 786.

11. Stoker, M. 1964. Virology 24: 165.

12. Stoker, M., C. O'Neill, S. Berryman, and V. Waxman. 1968. Int. J. Cancer 3: 683.

13. Clarke, G., M. Stoker, A. Ludlow, and M. Thornton. 1970. Nature 227: 798.

14. Jainchill, J. L., and G. J. Todaro. 1970. Exp. Cell Res. 59: 137.

15. Scher, C., G. J. Todaro. 1971. Exp. Cell Res. 68: 479.

16. Smith, H., and C. Scher. 1971. Nature 232: 558.

17. Smith, H., C. Scher, and G. J. Todaro. 1971. Virology 44: 359.

18. Ambrose, E. J., J. A. Dudgeon, D. M. Easty, and G. C. Easty. 1961. Exp. Cell Res. 24: 220.

19. Aub, J. C., C. Tieslau, and A. Lankester. 1963. Proc. Nat. Acad. Sci. 50: 613.

20. Burger, M. M., and A. R. Goldberg. 1967. Nature 219: 499.

21. Inbar, M., and L. Sachs. 1969. Proc. Nat. Acad. Sci. 63: 1418.

22. Burger, M. M., and G. S. Martin. 1972. Nature New Biol. 237: 9.

23. Kapeller, M., and F. Doljanski. 1972. Nature New Biol. 235: 184.

24. Kakunaga, T., and J. Kamahora. 1968. Biken J. 11: 313.

25. Goetz, I. E., B. R. Hill, and R. Kinoshita. 1969. Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 10: 30.

26. Ham, R. G. 1965. Proc. Nat. Acad. Sci. 53: 288.

27. Stoker, M., C. O'Neill, S. Berryman and V. Waxman. 1968. Int. J. Cancer 3: 683.

28. Stoker, M. 1968. Nature 218: 234.

29. Oppenhimer, S. B., and J. Odencrantz. 1972. Exp. Cell Res. 73: 475.

30. Djordjevic, B., and W. Szybalski. 1960. J. Exp. Med. 112: 509.

31. Puck, T., and F. Kao. 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. 58: 1227.

32. Wyke, J. 1971. Exp. Cell Res. 66: 203.

33. Wyke, J. 1971. Exp. Cell Res. 66: 209.

34. Vogel, A., and R. Pollack. 1973. J. Cell. Physiol. 82: 189.

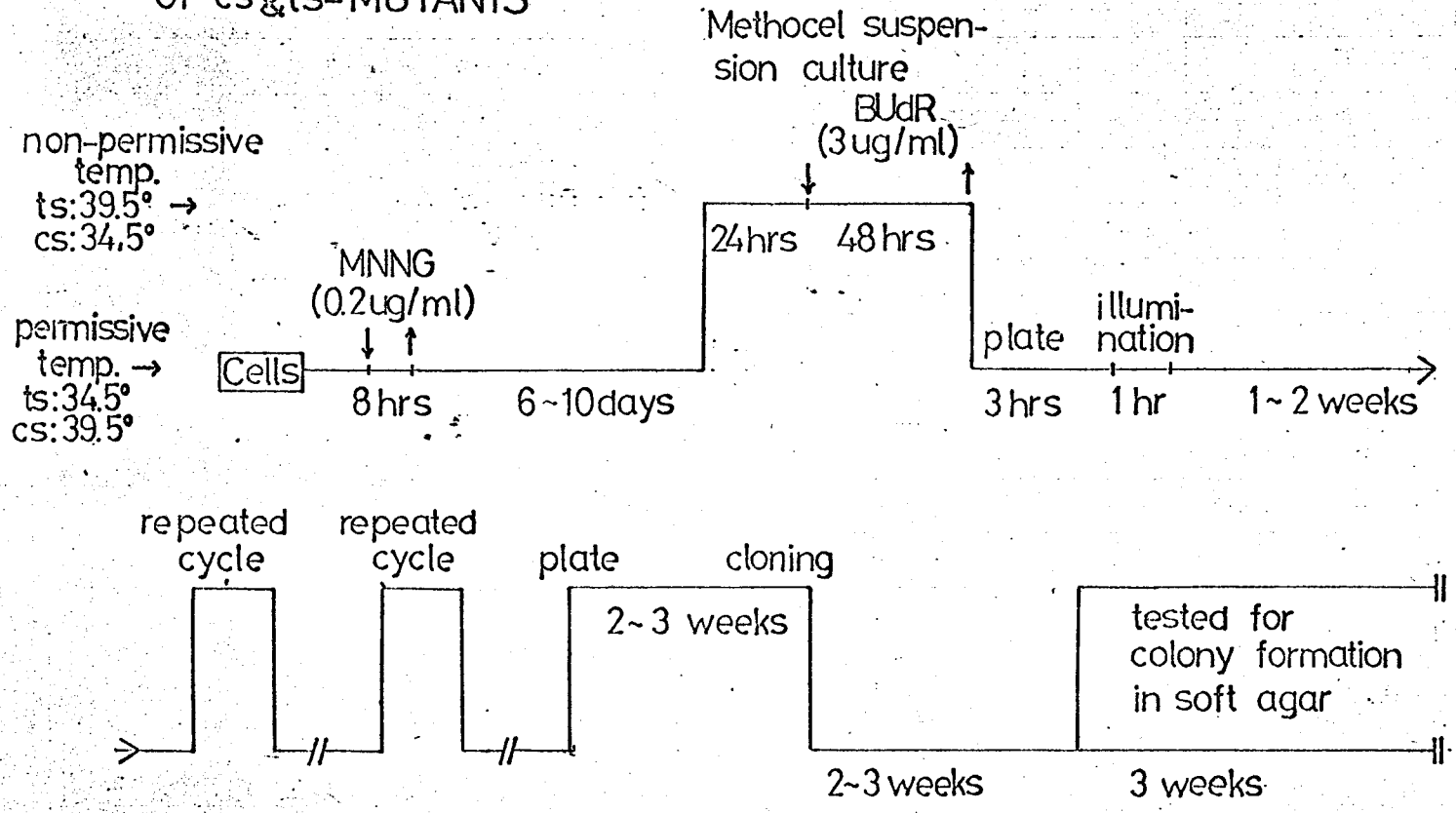
35. Chasin, L. A. 1973. J. Cell. Physiol. 82: 299.

36. Todaro, G. J., G. K. Lazar, and H. Green. 1965. J. Cell. Comp. Physiol. 66: 325.

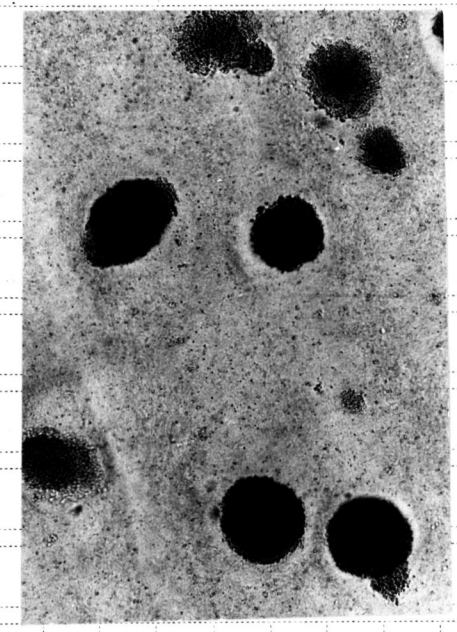
37. Di Mayorca, G., M. Greenblatt, T. Trauthen, A. Soller, and R. Giordano. 1973. Proc. Nat. Acad. Sci. 70: 46.

Fig. 1

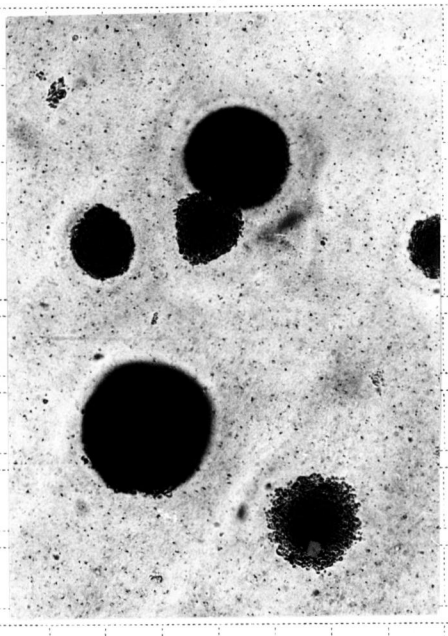
ISOLATION METHOD OF cs & ts-MUTANTS



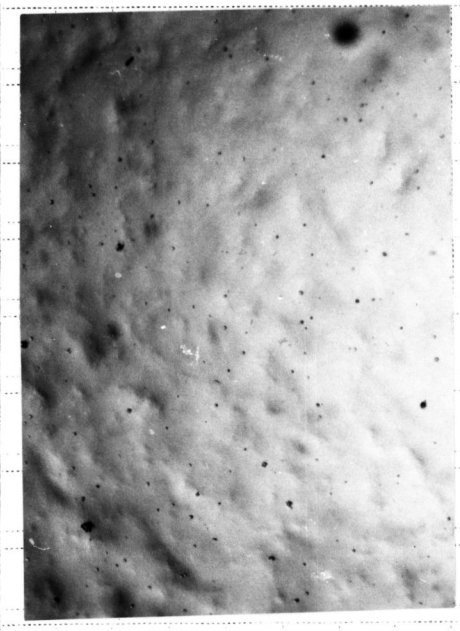
第2図a　軟寒天中コロニー形成（培養3週間）



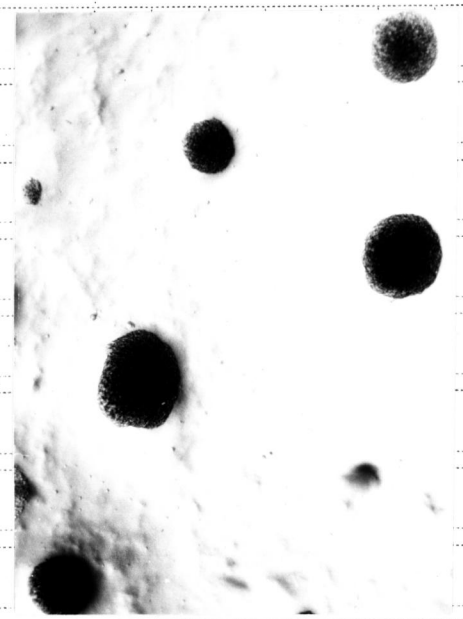
原株，39.5°C，×6



原株，34.5°C，×6



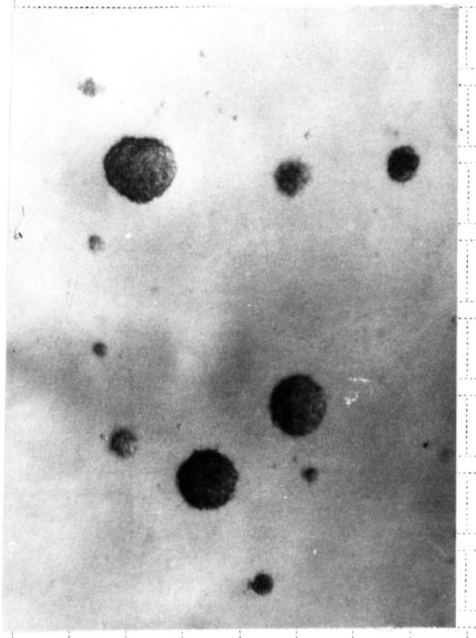
ts-171，39.5°C，×6



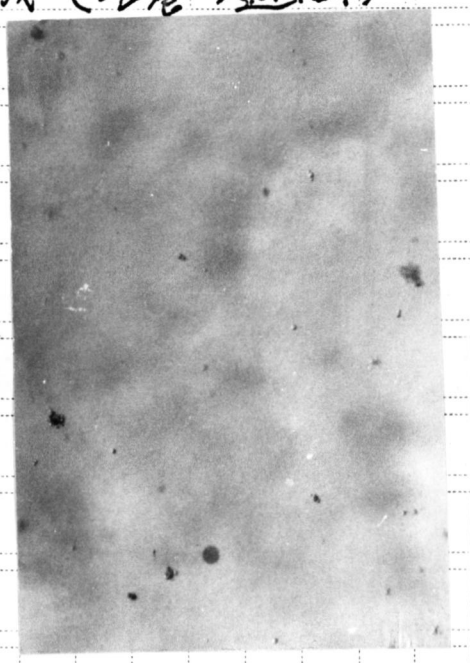
ts-171，34.5°C，×6

コクヨ　20×20

第2図b　軟寒天中コロニー形成（培養3週間）



CS-13D1, 39.5°C, ×6



CS-13D1, 34.5°C ×6

コクヨ　20×20

Fig.3 GROWTH CURVE

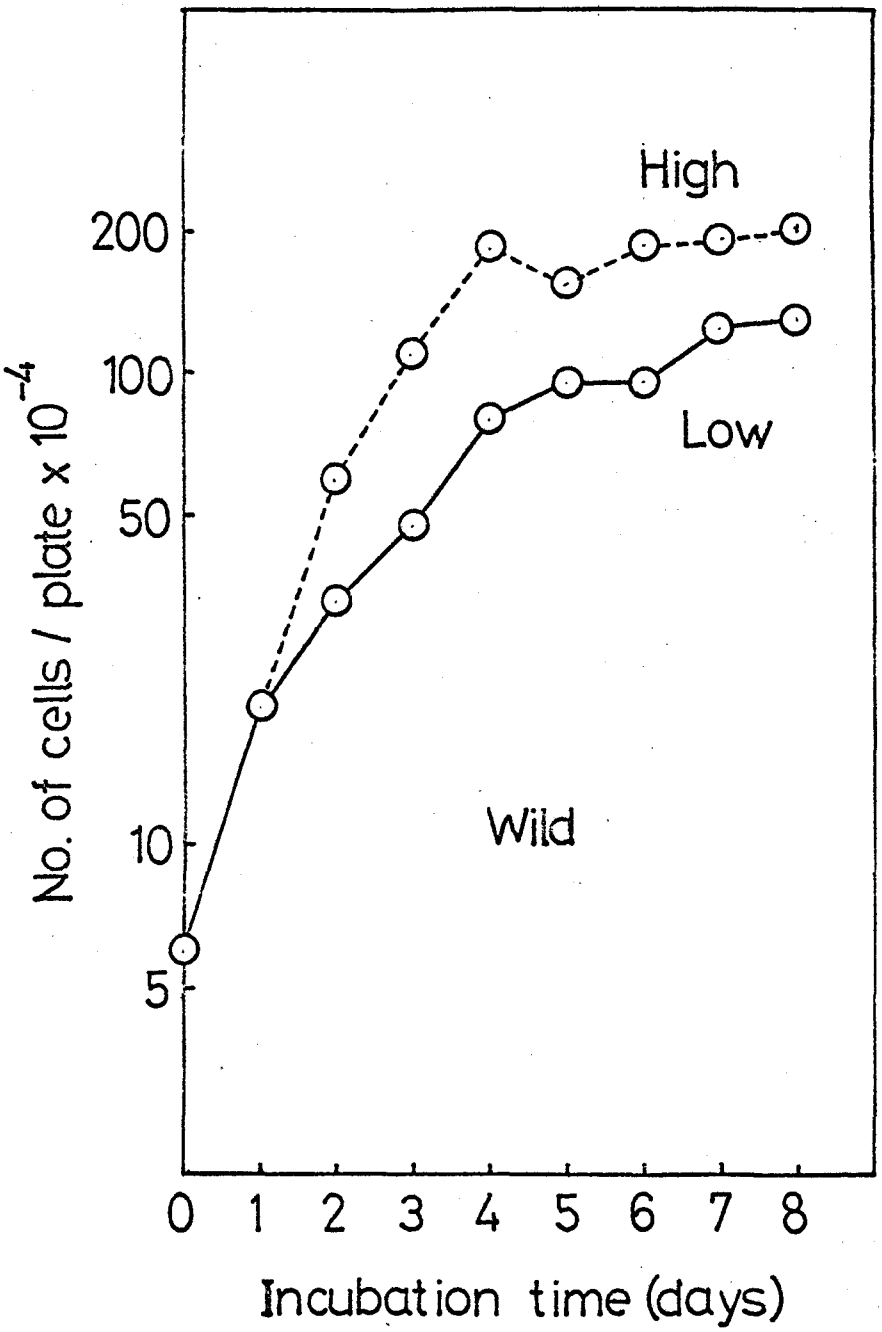


Fig.4 GROWTH CURVE

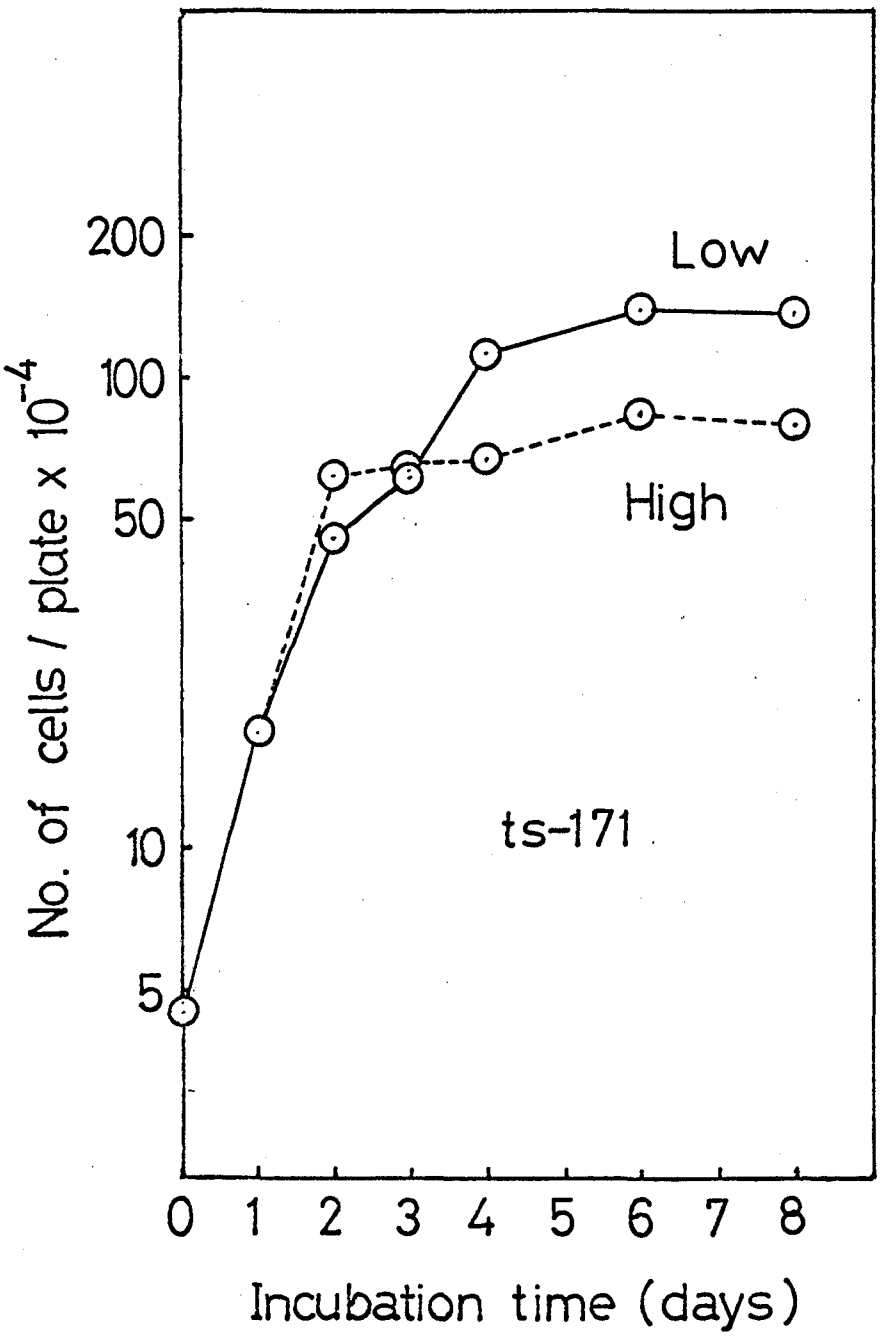
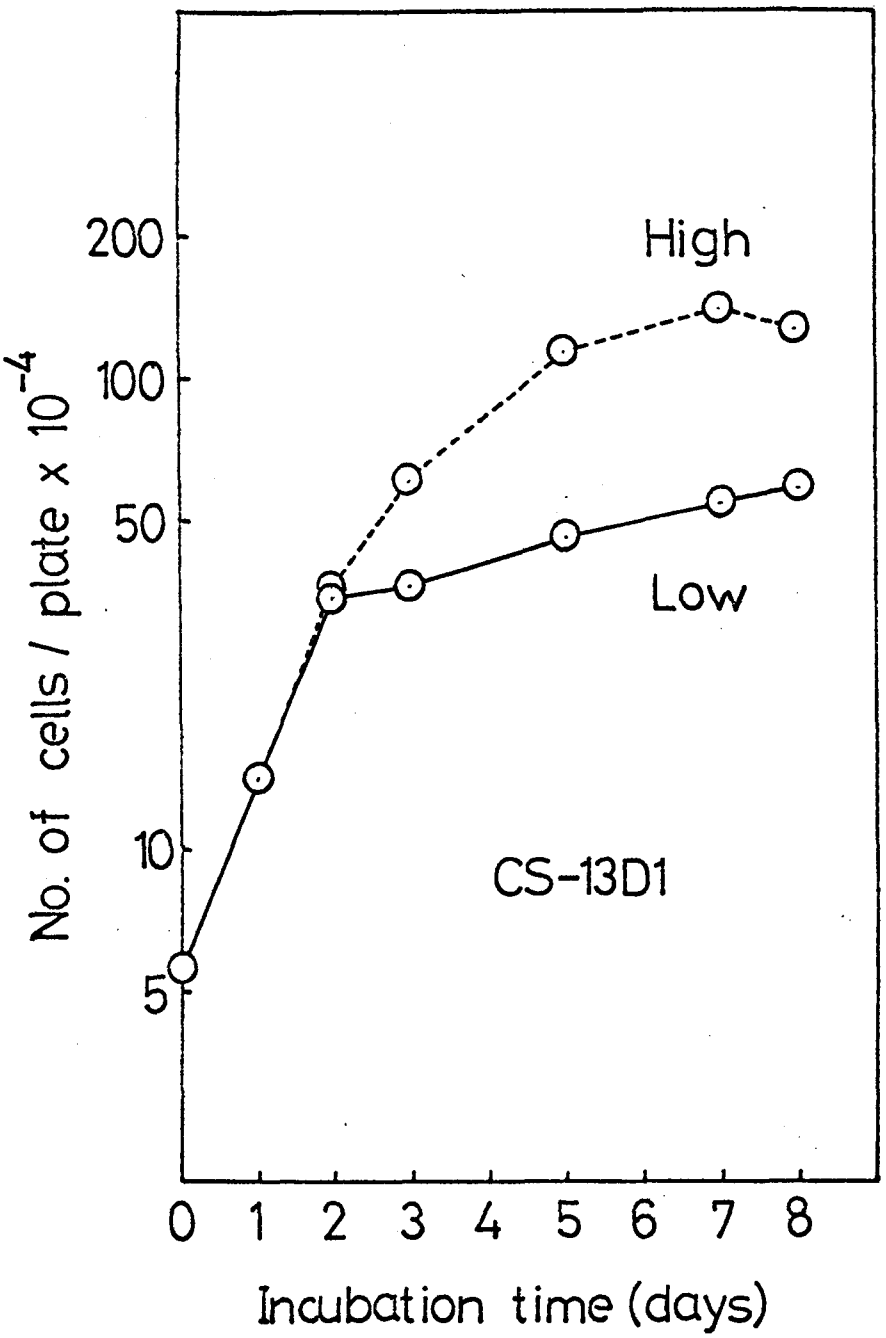
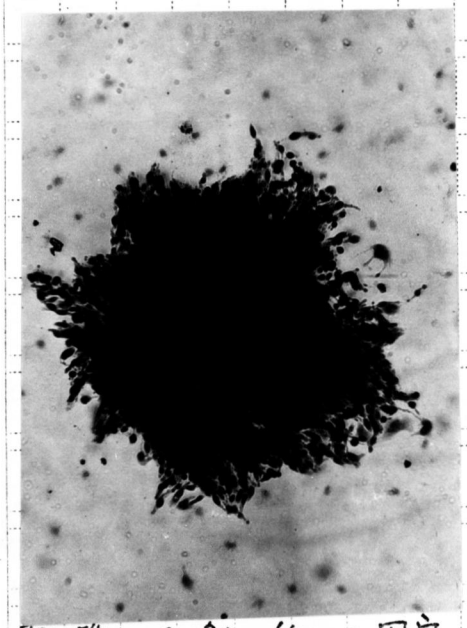


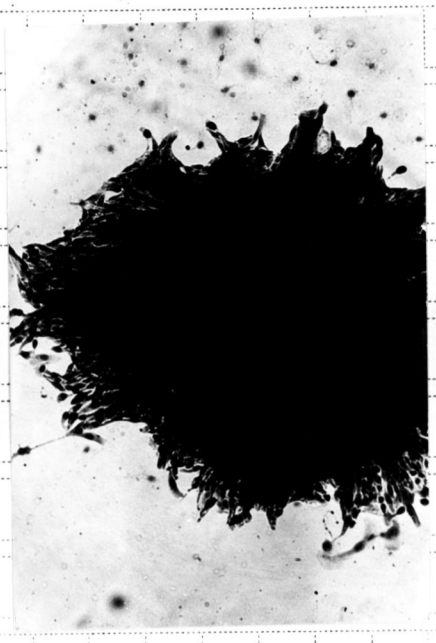
Fig.5 GROWTH CURVE



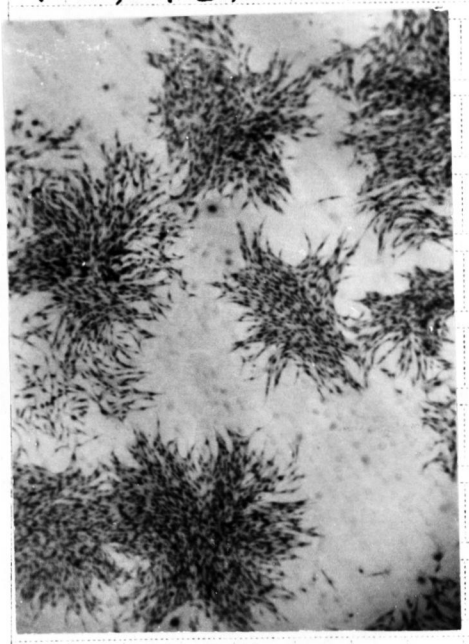
第6図a　平板培養でのコロニー形態（培養12日目）



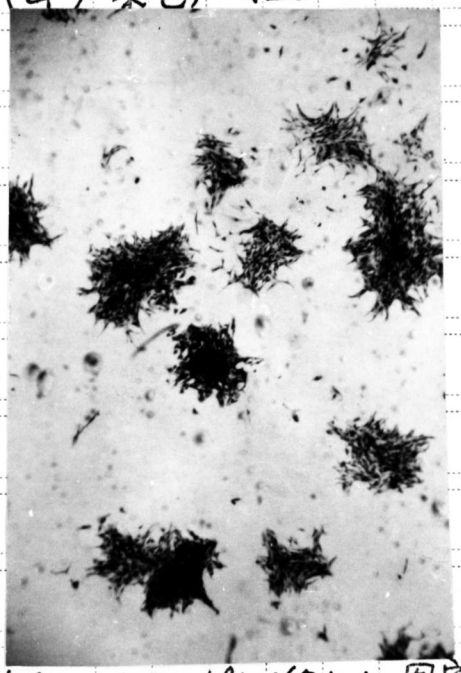
原株, 39.5℃, メタノール固定, ギムザ染色, ×20



原株, 34.5℃, メタノール固定, ギムザ染色, ×20

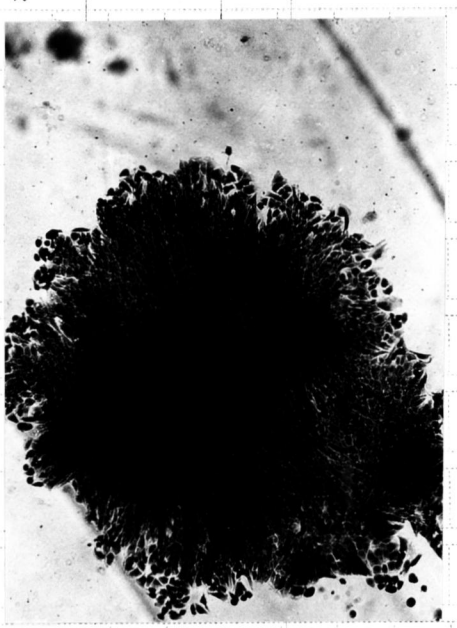


tS-164, 39.5℃, メタノール固定, ギムザ染色, ×6



tS-164, 34.5℃, メタノール固定, ギムザ染色, ×6

第6図b　平板培養でのコロニー形態（培養12日目）

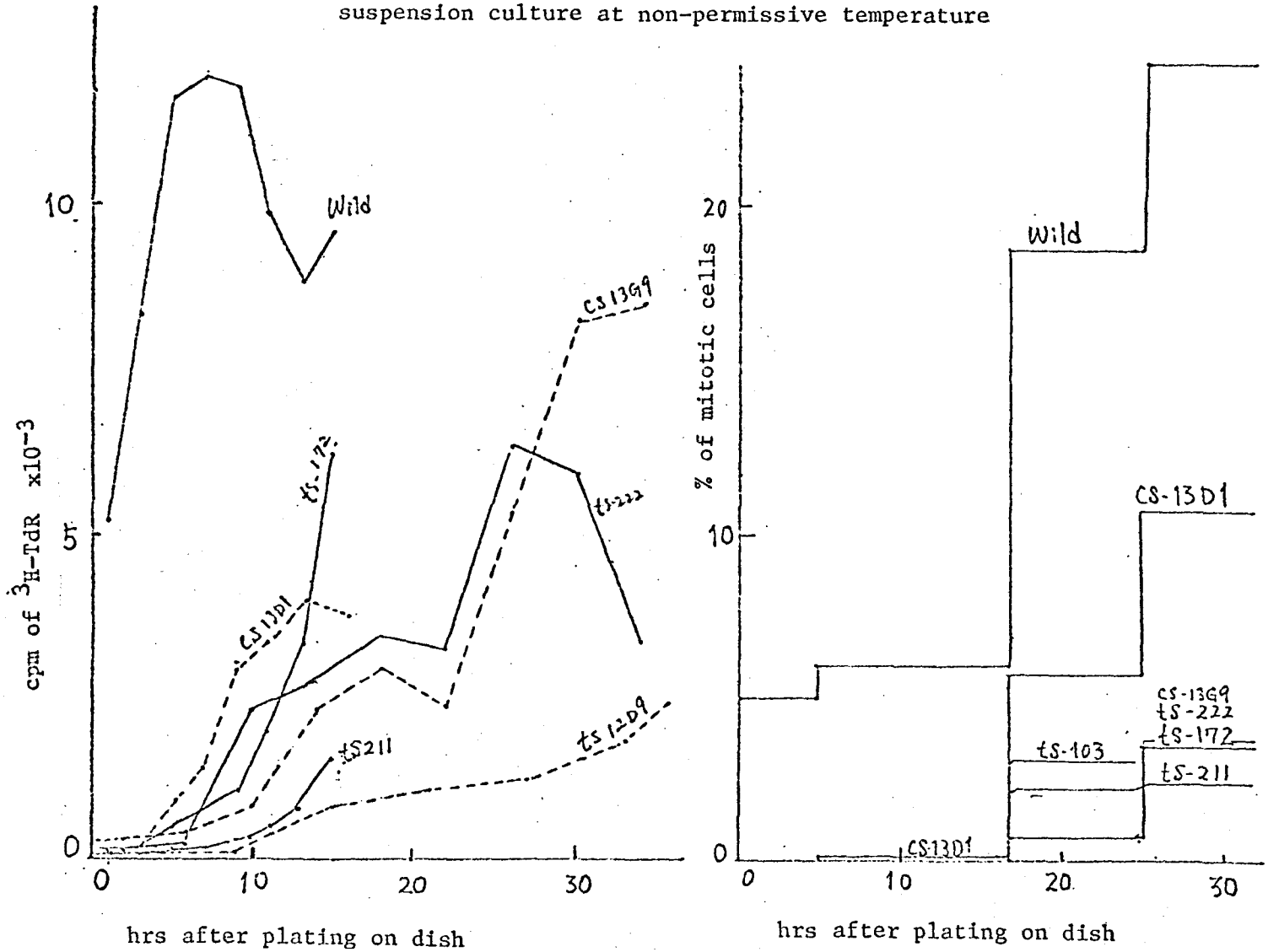


CS-13D1, 39.5°C, メタノール
固定, ギムザ染色, ×20

CS-13D1, 34.5°C, メタノール
固定, ギムザ染色, ×20

コクヨ　20×20

Fig. 7. DNA synthesis and mitotic index at permissive temperature after plating on dishes from Methocel-suspension culture at non-permissive temperature



第1表　変異株の分離率

	最終BUdR-光線照射後の生残細胞数*	平たい形態のコロニー*（クローニング株数）	変異株数	分離率 生残コロニー*数当り	分離率 平たいコロニー*数当り
高温感受性変異株	60,732	1,152	6	9.8×10^{-5}	5.2×10^{-3}
低温感受性変異株	11,600	328	3	2.6×10^{-4}	9.3×10^{-3}

*：平板上でコロニーを形成し得た細胞数を云う。

コクヨ 20×20

第2表　軟寒天ゲル内
コロニー形成率

細胞株	コロニー形成率(%)	
	高温(39.5℃)	低温(34.5℃)
原株	12.8	19.8
ts-103	1.19	17.3
ts-164	0.25	12.9
ts-171	1.24	24.3
ts-172	0.84	13.7
ts-211	0.41	14.4
ts-222	0.23	14.1
cs-12D9	17.7	0.04
cs-13D1	13.5	0.15
cs-13G9	11.3	0.30

植込細胞数：10^4 細胞/シャーレ
培養日数：21日間

コクヨ 20×20

Table III

EFFECT OF TEMPERATURE SHIFT (H→L) ON COLONY FORMING ABILITY IN SOFT AGAR

Days of temperature shift	No. of colonies / 10^4 cells	
	ts-222	cs-13D1
High → 3 6 9 21	23	1,352
	674	528
	780	52
	1,098	2
Low →	1,408	15

Table IV

EFFECT OF TEMPERATURE SHIFT (L→H) ON COLONY FORMING ABILITY IN SOFT AGAR

Days of temperature shift	No. of colonies / 10^4 cells	
	ts-222	cs-13D1
High 3 6 9 21	23	1,352
	33	1,628
	101	1,380
	366	584
Low	1,408	15

第5表 細胞数倍加時間

細胞株	細胞数倍加時間（時間）	
	高温（39.5℃）	低温（34.5℃）
原株	16.0	29.0
ts-103	17.1	20.9
ts-164	27.7	33.9
ts-171	14.9	20.4
ts-172	23.0	26.2
ts-211	13.9	17.6
ts-222	22.6	30.0
CS-12D9	18.3	33.8
CS-13D1	14.5	23.1
CS-13G9	13.2	30.2

コクヨ 20×20

第6表　飽和細胞密度

細胞株	飽和細胞密度 (細胞数/35mmプレート×10^{-6})	
	高温(39.5℃)	低温(34.5℃)
原株	1.9	1.3
ts-103	1.59	2.51
ts-164	0.94	1.70
ts-171	0.8	1.4
ts-172	3.35	4.40
ts-211	1.28	2.35
ts-222	0.86	1.08
CS-12D9	1.09	0.80
CS-13D1	1.23	0.68
CS-13G9	4.34	3.18

コクヨ　20×20

第7表　平板でのコロニー形成率

細胞株	平板でのコロニー形成率(%)	
	高温(39.5°C)	低温(34.5°C)
原株	16.6	42.9
ts-103	6.1	43.3
ts-164	2.2	21.2
ts-171	1.8	54.7
ts-172	42.9	69.4
ts-211	6.8	49.7
ts-222	54.6	84.4
CS-12D9	26.1	3.9
CS-13D1	82.7	72.2
CS-13G9	38.8	27.2

植込み細胞数：200細胞/シャーレ

コクヨ　20×20

第8表　無ガンマ・グロブリン血清中での増殖能（非許容温度）

細胞株	通常血清 Nx/No	無ガンマ・グロブリン血清 Nx/No
原株	×19.5	×16.4
tS-103	×6.5	×7.2
tS-164	×8.1	×7.3
tS-171	×21.0	×17.3
tS-172	×8.6	×15
tS-211	×8.8	×13
tS-222	×15	×22
cS-12D9	×23	×27
cS-13D1	×37	×49
cS-13G9	×10	×19

Nx……cSでは5日目の細胞数
　　tSでは4日目の細胞数
No……植込み細胞数.

コクヨ 20×20

第9表. コンAによる細胞凝集

細胞株	50%凝集に必要なコンA量 (μg/ml)	
	高温 (39.5°C)	低温 (34.5°C)
原株	200	300
ts-103	200	400
ts-164	130	425
ts-171	200	250
ts-172	125	400
ts-211	75	300
ts-222	156	300
CS-12D9	150	170
CS-13D1	75	175
CS-13G9	175	250

コクヨ 20×20